第 41 卷 增刊
1998 年 9 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 41, Suppl.
Sept., 1998

有机磷药剂对棉铃虫羧酸酯酶的抑制作用*

王 旭** 高希武*** 郑炳宗 李海涛
(中国农业大学昆虫学系，北京 100094)

摘要 该文分别以α-乙酸萘酯和β-乙酸萘酯为底物比较了22种常用有机磷药剂对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 羧酸酯酶的抑制作用。结果表明，棉铃虫羧酸酯酶对底物空间构型比较敏感，敌敌畏、对氧磷、地亚农、喹硫磷、马拉氧磷、异稻瘟净、增效磷、杀螟松抑制棉铃虫羧酸酯酶的能力较强。有机磷药剂抑制棉铃虫羧酸酯酶能力与其化学结构显著相关，氧化型的有机磷抑制能力明显强于硫代型的有机磷；乙氧基取代的有机磷抑制能力明显强于甲氧基取代的有机磷。

关键词 有机磷酸酯，羧酸酯酶，抑制中浓度

有机磷药剂的化学合成形成于 1820 年[1]，发展至今，已成为品种最多、世界市场份额最大[2]的一类化学农药。如能使有机磷类农药与菊酯类农药优势互补，利用资源丰富、价格便宜的有机磷农药，充分发挥拟除虫菊酯类农药杀虫毒力高的优点，则较为理想。

昆虫体内解毒酶系的降解作用是拟除虫菊酯类农药抗性的主要机制[3~9]，而诸多研究表明有机磷农药和拟除虫菊酯类农药复配增效与有机磷类农药抑制昆虫水解拟除虫菊酯类农药的酶系有关[10~14]。高希武、郑炳宗[15]研究表明，多种有机磷农药对蚜虫羧酸酯酶的抑制能力与它们对氰戊菊酯和溴氰菊酯的增效程度呈显著正相关。因此深入研究有机磷药剂与昆虫羧酸酯酶相互作用的性质对于药剂的合理使用具有重要意义。本文对 22 种常用的有机磷农药或增效剂抑制抗性害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 羧酸酯酶的能力进行了探索性的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

棉铃虫饲养：室内温度 24～25℃、相对湿度 70%～80%、光照 L:D 为 16 h:8 h 条件下，用人工饲料饲养的河北省邯郸品系棉铃虫 5 龄幼虫。将幼虫解剖，取其中肠，清除内容物，置 -20℃ 冰箱储存，储存 1 个月酶活性没有明显降低。用前加0.04 mol/L磷酸缓冲液匀浆，3 000 g 离心 15 min，上清液即作为羧酸酯酶酶源。

* 国家自然科学基金资助项目
** 现在上海动植物检疫局工作
*** 联系人
1997-06-27 收稿，1998-04-23 收修改稿

1.2 主要化学试剂和农药

α-乙酸萘酯（α-NA）和β-乙酸萘酯（β-NA），上海试剂一厂产品；十二烷基硫酸钠(SDS)，Fluka公司产品，中国医药公司北京公司进口分装；固蓝B盐，Fluka公司产品，上海化学试剂采购供应站分装。

乐果，97%原药，江苏大丰农药厂提供；久效磷，95%原药，江苏南通农药厂产品；对硫磷，98.7%原药，天津农药厂产品；甲胺磷，80%原药，苏州化工厂产品；氯辛硫磷，90%原药，上海农药厂产品；倍硫磷，95%原药，浙江黄岩农药厂产品；甲基辛硫磷，90%原药，天津农药厂产品；虫螨磷，95%原药，原英国ICI公司提供；甲基对硫磷，90%原药，天津农药厂产品；氧乐果，72.08%原药，涿州农药厂产品；对氧磷，90%原药，北京大学杨俭美先生提供；增效磷，98%原药，山东乐陵农药厂产品；喹硫磷，70%原药，浙江嘉兴农药厂产品；异稻瘟净，50%乳油，上海农药厂产品；马拉氧磷，55%原药，山东德州农药厂产品；马拉硫磷，91.96%原药，浙江宁波农药厂产品；敌敌畏，80%乳油，天津农药厂产品；乙酰甲胺磷，60%原药，广西灵山农药厂产品；杀螟松，90%原药，浙江宁波农药厂产品；甲基异柳磷，73.5%原药，山东青岛第二农药厂产品；地亚农，89%原药，上海农药厂产品；磷酸三苯酯（TPP），化学纯，北京化工厂产品。

1.3 羧酸酯酶测定方法

参照高希武[16]方法在试管中加入0.9 mL抑制剂（5～6个浓度）和0.1 mL酶液(酶浓度调整至对照OD值在0.4至0.8之间)，30℃水浴保温10 min后，加3.6 mL底物（3×10^{4} mol/L）继续在30℃条件下保温10 min，加显色剂1 mL，室温15 min后分别在600 nm（α-NA）或555 nm（β-NA）波长下测OD值。计算抑制率〔抑制率=（空白管OD值-抑制剂管OD值）/空白管OD值〕，用自编BASIC程序求抑制率与浓度对数值的线性回归方程并计算I_{50}值及置信限，由 Y 值预测 X 值的公式参考徐端正方法[17]。

2 结果与分析

2.1 不同杀虫药剂对棉铃虫羧酸酯酶抑制能力比较

实验结果表明，羧酸酯酶活性的被抑制率与抑制剂浓度对数或负对数呈显著的线性相关（$r>0.95$）。图1是22种药剂抑制羧酸酯酶PI_{50}值（I_{50}的负对数值）的变化趋势图。PI_{50}值大，表明抑制中浓度（I_{50}）值小，该药剂处于图的上方。

结果表明，在22种有机磷药剂中，敌敌畏和对氧磷抑制α-乙酸萘酯羧酸酯酶的能力最强，I_{50}值在10^{-8}数量级；地亚农、喹硫磷、马拉氧磷、对硫磷、杀螟松I_{50}值在10^{-7}数量级；增效磷、异稻瘟净、倍硫磷、甲基辛硫磷、甲胺磷、虫螨磷I_{50}值在10^{-6}数量级；甲基对硫磷、乐果、久效磷、氧乐果、氯辛硫磷I_{50}值在10^{-5}数量级；马拉硫磷、甲基异柳磷、TPP的I_{50}值在10^{-4}数量级；乙酰甲胺磷I_{50}值在10^{-3}数量级。其中甲基对硫磷、乐果和久效磷的I_{50}值无显著差异（$P>0.05$）。

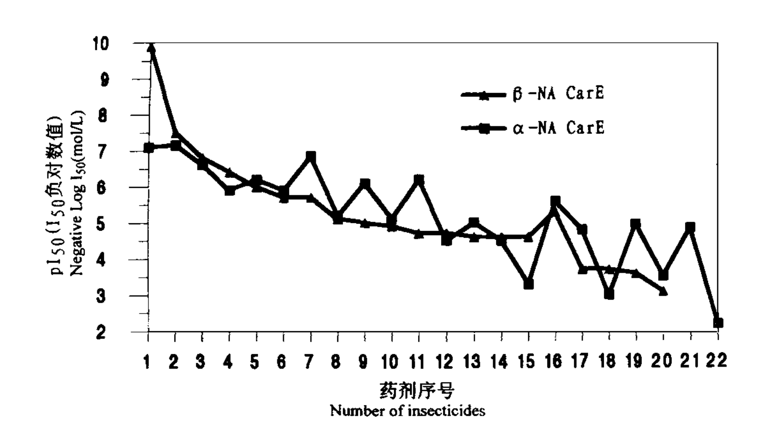


图1 22种有机磷药剂对羧酸酯酶抑制中浓度（I_{50}）比较

药剂序号：1. 对氧磷；2. 敌敌畏；3. 喹硫磷；4. 增效磷；5. 马拉氧磷；6. 异稻瘟净；7. 地亚农；8. 甲基辛硫磷；9. 杀螟松；10. 甲胺磷；11. 对硫磷；12. 氧乐果；13. 虫螨磷；14. 氯辛硫磷；15. 甲基异柳磷；16. 倍硫磷；17. 久效磷；18. TPP；19. 甲基对硫磷；20. 马拉硫磷；21. 乐果；22. 乙酰甲胺磷

Fig.1 Comparison of inhibiting potential (I_{50}) of organophosphate insecticides to carboxylesterase in *Helicoverpa armigera*

Number of insecticides: 1. Paraoxon; 2. DDVP; 3. Quinalphos; 4. SV1; 5. Malaoxon; 6. IBP; 7. Diazinon; 8. Phoxim-methyl; 9. Fenitrothion; 10. Methamidophos; 11. Parathion; 12. Omethoate; 13. Pirimiphos methyl; 14. Chlorphoxim; 15. Isofenphos-methyl; 16. Fenthion; 17. Monocrotophos; 18. TTP; 19. Parathion-methyl; 20. Malathion; 21. Dimethoate; 22. Acephate

22种药剂对β-乙酸萘酯羧酸酯酶的抑制能力，以对氧磷的抑制能力最强，I_{50}值在10^{-10}数量级，是位居第二的敌敌畏I_{50}值（10^{-8}数量级）的242倍；以下依次是喹硫磷、增效磷，10^{-7}数量级；马拉氧磷、异稻瘟净、地亚农、甲基辛硫磷、杀螟松，10^{-6}数量级；甲胺磷、对硫磷、氧乐果、虫螨磷、氯辛硫磷、甲基异柳磷、倍硫磷，10^{-5}数量级；久效磷、TPP、甲基对硫磷、马拉硫磷，10^{-4}数量级；乐果、乙酰甲胺磷I_{50}值大于10 mol/L，说明它们抑制β-乙酸萘酯羧酸酯酶的能力很弱。

在22种有机磷药剂中，对α-乙酸萘酯羧酸酯酶和β-乙酸萘酯羧酸酯酶抑制能力均较强的药剂有敌敌畏、对氧磷、地亚农、喹硫磷、马拉氧磷、异稻瘟净、增效磷、杀螟松。

2.2 有机磷类药剂抑制羧酸酯酶的结构与活性关系

表1显示出氧化型的有机磷抑制羧酸酯酶的能力明显强于硫代型的有机磷，分别以α-乙酸萘酯和β-乙酸萘酯为底物，马拉硫磷I_{50}值是马拉氧磷I_{50}值的560.6和857.3倍；对硫磷是对氧磷的7.8和12 500倍；乐果是氧乐果的2.0和8.1×10^5倍。乙氧基取代的有机磷对羧酸酯酶的抑制能力明显强于甲氧基取代的有机磷，I_{50}值甲基对硫磷是对硫磷的18.7和16.2倍。甲胺磷对羧酸酯酶的抑制能力明显高于乙酰甲胺磷，I_{50}值是甲胺磷的906.8和7.0×10^8倍。

表 1　一些杀虫药剂对棉铃虫羧酸酯酶抑制能力（I_{50}）比较

Table 1　Comparison of inhibiting potential (I_{50}) of organophosphate insecticides to carboxylesterase in *Helicoverpa armigera*

杀虫药剂名称 Insecticide	α-NA 羧酸酯酶（95%置信限） α-NA carboxylesterase (95%FL)	β-NA 羧酸酯酶（95%置信限） β-NA carboxylesterase (95%FL)
马拉氧磷 malaoxon	5.03×10^{-7} (4.56～5.54)	1.03×10^{-6} (0.99～1.08)
马拉硫磷 malathion	2.82×10^{-4} (2.80～2.84)	8.83×10^{-4} (7.91～9.86)
对氧磷 paraoxon	7.95×10^{-8} (7.82～8.09)	1.44×10^{-10} (1.39～1.49)
对硫磷 parathion	6.26×10^{-7} (6.09～6.43)	1.80×10^{-5} (1.41～2.30)
甲基对硫磷 parathion-methyl	1.17×10^{-5} (1.12～1.22)	2.92×10^{-4} (2.90～2.95)
氧化乐果 omethoate	1.38×10^{-5} (1.21～1.58)	1.97×10^{-5} (1.89～3.05)
乐果 dimethoate	2.75×10^{-5} (2.49～3.05)	$1.60\times10^{+1}$ (1.44～1.77)
甲胺磷 methamidophos	7.40×10^{-6} (7.00～7.83)	1.13×10^{-5} (1.08～1.19)
乙酰甲胺磷 acephate	6.71×10^{-3} (5.90～7.64)	$8.01\times10^{+3}$ (7.44～8.63)

2.3　羧酸酯酶对药剂反应异质性比较

在羧酸酯酶活性的抑制率与抑制剂浓度对数值线性关系式 $y=a+bx$ 中，抑制斜率 b 值等于单位抑制剂浓度对数值的变化引起的羧酸酯酶活性抑制率的改变值，它反映了羧酸酯酶对抑制药剂敏感度的异质性。表 2、表 3 分别是 22 种实验药剂对 α-NA 羧酸酯酶和 β-NA 羧酸酯酶的抑制回归线斜率（b 值）的排列顺序表。从表中可以看出，大多数实验药剂的 b 值都大于 0.2，说明多数有机磷药剂都能在一个浓度梯度内实现对棉铃虫羧酸酯酶的抑制能力从低到高的转变。

表 2　22 种有机磷药剂对 α-乙酸萘酯羧酸酯酶的抑制回归线斜率（b 值）比较

Table 2　Comparison of slope of inhibiting regression line on organophosphate insecticides to carboxylesterase (α-naphthyl acetate as substrate) in *Helicoverpa armigera*

序号 Number	药剂 Insecticide	b 值 ± Se Slope ± Se	序号 Number	药剂 Insecticide	b 值 ± Se Slope ± Se
1	SV1	$0.525\pm7.00\times10^{-2}$	12	对氧磷 paraoxon	$0.275\pm1.45\times10^{-3}$
2	喹硫磷 quinalphos	$0.444\pm6.33\times10^{-3}$	13	对硫磷 parathion	$0.256\pm2.13\times10^{-3}$
3	氯辛硫磷 chlorphoxim	$0.431\pm7.12\times10^{-3}$	14	甲基对硫磷 parathion-methyl	$0.253\pm3.96\times10^{-3}$
4	甲胺磷 methamidophos	$0.424\pm9.77\times10^{-3}$	15	氧乐果 omethoate	$0.251\pm7.86\times10^{-3}$
5	DDVP	0.397 ± 0.1013	16	虫螨磷 Pirimiphos methyl	$0.235\pm5.84\times10^{-3}$
6	异稻瘟净 Kitazin P (IBP)	$0.397\pm3.15\times10^{-2}$	17	倍硫磷 Fenthion	$0.229\pm1.53\times10^{-2}$
7	地亚农 diazinon	$0.372\pm1.64\times10^{-3}$	18	久效磷 monocrotophos	$0.212\pm1.25\times10^{-2}$
8	杀螟松 fenitrothion	$0.327\pm1.05\times10^{-3}$	19	马拉硫磷 malathion	$0.183\pm3.09\times10^{-4}$
9	乐果 demethoate	$0.321\pm1.23\times10^{-2}$	20	乙酰甲胺磷 Acephate	$0.162\pm3.94\times10^{-3}$
10	甲基辛硫磷 Phoxim-methyl	$0.281\pm1.68\times10^{-2}$	21	甲基异柳磷 Isofenphos-methyl	$0.150\pm2.30\times10^{-3}$
11	马拉氧磷 malaoxon	$0.277\pm7.51\times10^{-3}$	22	TPP	$0.118\pm2.85\times10^{-3}$

表3 22种有机磷药剂对β-乙酸萘酯羧酸酯酶的抑制回归线斜率（*b*值）比较

Table 3 Comparison of slope of inhibiting regression line on organophosphate insecticides to carboxylesterase (β-naphthyl acetate as substrate) in *Helicoverpa armigera*

序号 Number	药剂 Insecticide	*b*值±*Se* Slope±*Se*	序号 Number	药剂 Insecticide	*b*值±*Se* Slope±*Se*
1	氯辛硫磷 chlorphoxim	$0.621 \pm 1.40 \times 10^{-2}$	12	甲胺磷 methamidophos	$0.311 \pm 5.84 \times 10^{-3}$
2	对硫磷 parathion	$0.618 \pm 8.60 \times 10^{-2}$	13	久效磷 monocrotophos	$0.301 \pm 9.07 \times 10^{-3}$
3	地亚农 diazinon	$0.526 \pm 3.68 \times 10^{-3}$	14	异稻瘟净 IBP	$0.272 \pm 1.01 \times 10^{-2}$
4	DDVP	0.462 ± 0.01	15	甲基异柳磷 Isofenphos-methyl	$0.259 \pm 2.76 \times 10^{-3}$
5	甲基辛硫磷 Phoxim-methyl	$0.436 \pm 6.13 \times 10^{-3}$	16	SV1	$0.235 \pm 4.21 \times 10^{-3}$
6	氧乐果 omethoate	$0.385 \pm 6.06 \times 10^{-3}$	17	TPP	$0.229 \pm 3.90 \times 10^{-3}$
7	喹硫磷 quinalphos	$0.384 \pm 1.24 \times 10^{-2}$	18	马拉氧磷 malaoxon	$0.211 \pm 2.94 \times 10^{-3}$
8	甲基对硫磷 parathion-methyl	$0.380 \pm 1.55 \times 10^{-3}$	19	对氧磷 paraoxon	$0.144 \pm 7.67 \times 10^{-4}$
9	杀螟松 fenitrothion	$0.345 \pm 6.37 \times 10^{-3}$	20	马拉硫磷 malathion	$0.135 \pm 2.26 \times 10^{-3}$
10	虫螨磷 pirimiphos-methyl	$0.323 \pm 2.16 \times 10^{-2}$	21	乙酰甲胺磷 acephate	$0.046 \pm 1.76 \times 10^{-4}$
11	倍硫磷 fenthion	$0.317 \pm 1.00 \times 10^{-2}$	22	乐果 dimethoate	$0.042 \pm 4.06 \times 10^{-4}$

3 讨论

从图1可以看出，分别以α-乙酸萘酯和β-乙酸萘酯为底物比较有机磷药剂抑制羧酸酯酶的能力得出的排列次序是不一致的，说明棉铃虫羧酸酯酶与一对同分异构体的α-乙酸萘酯和β-乙酸萘酯的作用性质有很大差异，棉铃虫羧酸酯酶对底物的空间构型可能很敏感。从抑制剂角度来看，敌敌畏、喹硫磷、异稻瘟净、甲基辛硫磷、甲胺磷、氧乐果、氯辛硫磷对α-乙酸萘酯羧酸酯酶和β-乙酸萘酯羧酸酯酶的I_{50}值很接近，说明这些药剂抑制α-乙酸萘酯羧酸酯酶和β-乙酸萘酯羧酸酯酶的性质比较接近。而对氧磷、地亚农、对硫磷、杀螟松、倍硫磷、甲基对硫磷、久效磷、乐果、甲基异柳磷、乙酰甲胺磷对α-乙酸萘酯羧酸酯酶和β-乙酸萘酯羧酸酯酶的I_{50}值差异很大，说明它们抑制α-乙酸萘酯羧酸酯酶和β-乙酸萘酯羧酸酯酶的性质有较大差异。说明继续深入研究底物与羧酸酯酶、抑制剂与羧酸酯酶相互作用的性质具有重要意义。

从几组结构相似有机磷药剂抑制羧酸酯酶的能力比较来看，有机磷药剂抑制羧酸酯酶的能力与它们的化学结构显著相关。氧化型的有机磷药剂（马拉氧磷、对氧磷、氧乐果）的抑制能力比硫代型有机磷药剂（马拉硫磷、对硫磷、乐果）明显地强，它们的I_{50}值一般相差几百倍，最大可相差1万多倍，这种巨大的差异是因为O比S有更强的吸电子能力，使得氧化型有机磷药剂的P原子比硫代型有机磷药剂P原子带有更强的

正电性，也就更易于与羧酸酯酶的活性中心丝氨酸发生反应，使酶失活[1,18]。对硫磷和甲基对硫磷抑制羧酸酯酶能力的比较说明用O-乙基替代与P原子相连的O-甲基可以提高有机磷药剂抑制羧酸酯酶的能力。在甲胺磷与P原子连接的胺基上再连接一个乙酰基显然能大幅度地降低有机磷药剂抑制羧酸酯酶的能力，而且也大幅度地降低了羧酸酯酶对有机磷药剂的敏感度（抑制率降低了2.6和6.77倍）。从多组结构相似有机磷药剂抑制羧酸酯酶的能力来看，离P原子越近的烷基变化对有机磷药剂抑制棉铃虫羧酸酯酶能力的影响可能越大。

参　考　文　献

1 江藤永松．有机磷农药的有机化学与生物化学．北京：化学工业出版社，1981

2 吴士雄，张　凌．论我国农药混配现状与管理．农药科学与管理，1993，(4)：1～5

3 Chang C K, Jordan T W. Penetration and metabolism of topically permethrin and cypermethrin in pyrethroid-tolerant *Wiseana cervinata* larvae. Pestic. Biochem. & Physiol., 1982, 17: 96～204

4 Dowd P F, Sparks T C. Comparisons of midgut fat body and cuticular enzymes from *Pseudoplusia includens* (Walker) and *Heliothis virescens* (F.) responsible for the hydrolysis of permethrin and fenvalerate. Pestic. Biochem. & Physiol., 1987, 27: 309～317

5 Jao L T, Casida J E. Insect pyrethroid-hydrolyzing esterases. Pestic. Biochem. & Physiol., 1974, 4: 464～472

6 Jersey J D, Nolan J, Davey P A, Riddles P W. Separation and characterization of the pyrethoid-hydrolyzing esterases of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Pestic. Biochem. & Physiol., 1985, 23: 349～357

7 Schnitzerling H J, Nolan J, Hughes S. Toxicology and metabolism of some synthetic pyrethroids in larvae of susceptible and resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). Pestic. Sci., 1983, 14: 64～72

8 Devonshire A L, Moores G D. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). Pestic. Biochem. & Physiol., 1982, 18: 235～246

9 Devonshire A L. The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. Biochem. J., 1977, 167: 675～683

10 Chang C K, Jordan T W. Inhibition of permethrin-hydrolyzing esterases from *Wiseana cervinata* larvae. Pestic. Biochem. & Physiol., 1983, 19: 190～195

11 Dowd P F, Sparks T C. Inhibition fo trans-permethrin hydrolysis in *Pseudoplusia includens* (Walker) and use of inhibitors as pyrethroid synergists. Pestic. Biochem. & Physiol., 1987, 27: 237～245

12 Gaughan L C, Engel J L, Casida J E. Pesticide interactions: effects of organophosphorus pesticides on the metabolism, toxicity, and persistence of selected pyrethroid insecticides. Pestic. Biochem. & Physiol., 1980, 14: 81～85

13 Ishaaya I, Mendelson Z, Ascher K R S, Casida J E. Cypermethrin synergism by pyrethriod esterase inhibitors in adults of the whitefly *Bemisia tabaco*. Pestic. Biochem. & Physiol., 1987, 28: 155～162

14 Xu G, Qin J. Extraction and characterization of midgut proteases from *Heliothis armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their inhibition by tannic acid. Proceeding of the National Academy of Sciences, 1994, 87 (2): 334～338

15 高希武，郑炳宗．几种农药对蚜虫羧酸酯酶的抑制和拟除虫菊酯的增效．北京农业大学学报，1991，17 (4)：89～94

16 高希武．改进的Ellman法测定有机磷酸酯和氨基甲酸酯杀虫剂抑制AChE的能力．农药，1988，27 (1)：56～57

17 徐端正．生物统计在药理学中的应用．北京：科学出版社，1986

18 唐振华．昆虫抗药性及其治理．北京：农业出版社，1993

INHIBITION OF ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES TO CARBOXYLESTERASE IN *HELICOVERPA ARMIGERA*

Wang Xu Gao Xiwu Zheng Bingzong Li Haitao
(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract The inhibition of 22 organophosphates (OP) to the activity of carboxylesterase, using α- and β-naphthyl acetate as substrate separately, was investigated in cotton bollworms (*Helicoverpa armigera*). The inhibition potential of paraoxon, dichlorvos, SV1, quinalphos, malaoxon, IBP were much stronger than the other insecticides tested. The relationship between chemical structure and the inhibition potential to carboxylesterase was also studied. The inhibition potential was: phosphate > phosphorothionate, phosphorothiolate > phosphorodithioate, phosphoramidate > phosphorothiolamidate and $(C_2H_5O)_2OP$ > $(CH_3O)_2OP$.

Key words organophosphate insecticide, carboxylesterase, median inhibiting concentration